



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, 15/63, 15/82, 9/16	A1	(11) 国際公開番号 WO96/30510 (43) 国際公開日 1996年10月3日 (03.10.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/00812 (22) 国際出願日 1996年3月28日 (28.03.96) (30) 優先権データ 特願平7/96126 1995年3月29日 (29.03.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社(JAPAN TOBACCO INC.)[JP/JP] 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 森岡真二(MORIOKA, Shinji)[JP/JP] 植木 潤(UEKI, Jun)[JP/JP] 〒438 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
<p>(54) Title : DNA FRAGMENT, RECOMBINATION VECTOR CONTAINING THE SAME, AND METHOD OF THE EXPRESSION OF ALIEN GENE WITH THE USE OF THE SAME</p> <p>(54) 発明の名称 DNA断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた外来遺伝子の発現方法</p> <div style="text-align: center;"> <p>a ... DNA insert</p> </div> <p>(57) Abstract</p> <p>A novel DNA which has a sequence different from those of publicly known DNAs capable of promoting the expression of an alien gene and can remarkably promote the expression of an alien gene. An isolated DNA fragment having a base sequence represented by SEQ ID NO:1 in the Sequence Listing; and an isolated DNA fragment represented by this base sequence wherein one or more nucleotides have been added, inserted, deleted or replaced and having the effect of promoting the expression of a gene located in the downstream thereof.</p>		

(57) 要約

外来遺伝子の発現を促進することができる公知のDNAとは異なる配列を有する、新規なDNAであって、外来遺伝子の発現を大いに促進することができるDNAが開示されている。本発明は、配列表の配列番号1で示される塩基配列を有する単離されたDNA断片及び該塩基配列において1又は複数のヌクレオチドが付加、挿入、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有する単離されたDNA断片を提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	EE	エストニア	LR	レソト	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	ES	スペイン	LS	レソト	UD	ウズベキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SS	スウェーデン
BB	バハマ	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	MC	モナコ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドバ共和国	SN	セネガル
BR	ブラジル	GU	グアム	MG	マダガスカル	SS	スウェーデン
BY	ベラルーシ	HE	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
CA	カナダ	IL	イスラエル	ML	マリ	TG	トーゴ
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CF	コンゴ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	JP	日本	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CM	カメルーン	KR	韓国	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CN	中国	KZ	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CU	キューバ共和国		カザフスタン	NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
CZ	チェコ共和国			NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
						VN	ベトナム

明細書

DNA断片、それを含む組換えベクター及びそれを用いた外来遺伝子の発現方法

技術分野

本発明は、遺伝子の発現を促進する作用を有する新規なDNA断片、それを含
5 む組換えベクター及びそれを用いた外来遺伝子の発現方法に関する。

背景技術

外来遺伝子の発現を促進することは、遺伝子工学の手法を植物に応用する際に
最も必要とされる技術のひとつである。その方法のひとつとして遺伝子の発現を
促進する塩基配列を持つDNAの利用が挙げられる。

10 外来遺伝子の発現を促進する塩基配列としては、ヒマのカタラーゼのイントロ
ン（特開平 03-103182; Tanaka et al. Nucleic Acids Res. 18, 6767-6770 (1
990)）等が知られている。しかしながら、対象とする植物が多岐にわたること、
また目的とする生育段階あるいは組織器官での発現促進が必要になることから、
多くの種類の遺伝子発現を促進するDNAが利用できることが望まれる。

15 発明の開示

従って、本発明の目的は、外来遺伝子の発現を促進することができる公知のD
NAとは異なる配列を有する、新規なDNAであつて、外来遺伝子の発現を促進
することができるDNAを提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、イネのホスホリハーゼD（以下、「PLD
20 」ということがある）のcDNAとイネのゲノムDNAとの塩基配列を比較する
ことによりイネPLD遺伝子のイントロンを見出し、かつ、これらのイントロン
のうちの1つがその下流の遺伝子の発現を顕著に促進する効果を有することを見
出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号1で示される塩基配列を有する単離さ
25 れたDNA断片及び該塩基配列において1又は複数のヌクレオチドが付加、挿入、
欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作
用を有する単離されたDNA断片を提供する。また、本発明は、前記本発明のD
NA断片と、その下流に機能的に連結された発現すべき外来遺伝子とを含む組換
えベクターを提供する。さらに、本発明は、前記本発明の組換えベクターを宿主

細胞に導入し、前記外来遺伝子を発現させることから成る、外来遺伝子の発現方法を提供する。

下記実施例において実験的に確認されたように、本発明のDNA断片は、その下流に位置する遺伝子の発現を大幅に促進する。従って、本発明は、遺伝子工学的
5 的手法により外来遺伝子を発現させることに大いに貢献するものと考えられる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の実施例において本発明のDNA断片を挿入したpB1221の遺伝子地図の要部である。

発明を実施するための最良の形態

10 上述のように、本発明のDNA断片は配列表の配列番号1に示す塩基配列を有する。本発明のDNA断片は、下記実施例において詳述するように、イネPLD遺伝子のcDNAと、対応するイネゲノムDNAとの塩基配列を比較することによりイネPLD遺伝子上流のイントロンを同定し、これらのイントロンのうち5
15 非翻訳領域に対応する位置に存在する173bpのイントロン配列を含む断片をPCRにより調製してレポーター遺伝子を有する発現ベクターの該レポーター遺伝子上流に組み込み、該レポーター遺伝子の発現活性を比較することにより、
20 下流の遺伝子の発現を促進する作用を確認したものである。本発明のDNA断片の塩基配列は、イネゲノム中のPLD遺伝子の塩基配列を示す配列表の配列番号3に示されるイネゲノミックPLD遺伝子の塩基配列の第1661塩基から第1843塩基に相当する。

なお、イネPLD遺伝子上流に存在する上記173bpのイントロン配列の塩基配列を配列表の配列番号4に示す。配列番号4に示される配列も、当然、下流の遺伝子の発現を促進する作用を有する。配列番号4に示す塩基配列は、イネゲノム中のPLD遺伝子の塩基配列を示す配列表の配列番号3に示されるイネゲノ
25 ミックPLD遺伝子の塩基配列の第1666塩基から第1838塩基に相当する。

本発明のDNA断片は、イネPLD遺伝子上流に存在するイントロンであり、本発明によりその塩基配列が明確になっているので、イネのゲノムDNAを鋳型とするPCRにより容易に調製することができる。PCRは遺伝子工学の分野において多用される常法であり、そのためのキットも市販されているので当業者

ならば容易に実施可能である。また、その具体的な一例が下記実施例に詳述されている。

なお、一般に、生理作用を有するDNA配列において、1又は複数のヌクレオチドが付加、挿入、欠失若しくは置換された場合であっても、その生理活性を維持する場合があることは当業者において広く認められているところである。本発明には、このような修飾が加えられ、かつ下流の遺伝子の発現を促進する作用を有するDNA断片も含まれる。すなわち、配列表の配列番号1で示される塩基配列において1又は複数のヌクレオチドが付加、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有するDNA断片も本発明の範囲内に含まれる。特に、配列番号1で示される塩基配列のうち5'末端側の5塩基及び3'末端側の6塩基はエクソン部分であるので、これらの配列が欠失しているものも遺伝子発現促進作用を有するものと考えられ、これらも本発明の範囲に含まれる。

ヌクレオチドの付加、挿入、欠失又は置換は、例えば周知技術である部位特異的変異誘発（例えばNucleic Acid Research, Vol. 10, No. 20, p6487-6500, 1982）により実施することができ、本明細書において「1又は複数のヌクレオチド」とは、部位特異的変異誘発法により付加、挿入、欠失又は置換できる程度の数のヌクレオチドを意味する。

部位特異的変異誘発は、例えば、所望の変異である特定の不一致の他は変異を受けるべき一本鎖ファージDNAに相補的な合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて次のように行うことができる。すなわち、プライマーとして上記合成オリゴヌクレオチドを用いてファージに相補的な鎖を合成させ、得られた二重鎖DNAでファージ担持性宿主細菌を形質転換する。形質転換された細菌の培養物を寒天にプレートし、ファージを含有する単一細胞からブランクを形成せしめる。そうすると、理論的には、50%の新コロニーが単鎖として変異を有するファージを含有し、残りの50%が元の配列を有する。得られたブランクを、上記所望の変異を有するDNAと完全に一致するものとはハイブリッド形成するが、もとの鎖を有する不一致のものとはハイブリッド形成しない温度において、キナーゼ処理された合成プローブとハイブリッド形成せしめる。次に該プローブとハイブ

リド形成するブランクを拾い、培養し、DNAを回収する。

なお、塩基配列に、下流の遺伝子の発現を促進する作用を喪失せしめない1又は複数のヌクレオチドの置換、欠失、付加又は挿入の方法としては、上記の部位特異的変異誘発の他にも、遺伝子を変異原で処理する方法及び遺伝子を選択的に
5 開裂し、次に選択されたヌクレオチドを除去、付加、挿入又は置換し、次いで連結する方法もある。

本発明のDNA断片は、その下流の遺伝子の発現を促進する作用を有する。従って、発現させるべき所望の外来遺伝子の転写領域、好ましくは転写領域の5'末端側の領域に本発明のDNA断片を挿入することにより、該外来遺伝子の発現
10 を促進することができる。外来遺伝子の発現方法は遺伝子工学の分野において既に確立されている。すなわち、発現ベクターのクローニング部位に所望の外来遺伝子を挿入し、これを宿主細胞に導入して発現させることにより外来遺伝子が発現させることができる。そして、本発明の方法では、このような常法による外来遺伝子の発現方法において、該外来遺伝子の上流に上記本発明のDNA断片を、
15 該外来遺伝子と機能的に連結された態様で挿入して、該外来遺伝子の発現を行う。ここで、本発明のDNA断片がその下流の発現すべき遺伝子と「機能的に連結された」とは、本発明のDNA断片を挿入することにより、これを挿入しない場合に比べて前記外来遺伝子の発現が検出可能な程度に増加することを意味する。本発明のDNAは発現を促進すべき外来遺伝子の直上流に挿入されていてもよいが、
20 本発明のDNAと該外来遺伝子の間に他の配列が介在していてもよい。この介在する配列の長さは特に限定されないが、通常0～1000bp程度である。また、本発明のDNA断片の上流には、プロモーター配列が存在するが、本発明のDNA断片はプロモーターの直下流に挿入されていてもよいし、プロモーターと本発明のDNAの間に他の配列が介在していてもよい。この介在する配列の長さは特
25 に限定されないが、通常0～1000bp程度である。要は、本発明のDNA断片を挿入することにより、これを挿入しない場合に比べて前記外来遺伝子の発現が検出可能な程度に増加する組換えベクターは、全て本発明の範囲内に含まれる。

本発明のDNA断片のベクター中への挿入は、発現ベクターのクローニング部位の塩基配列がわかっているので、適当な制限酵素や必要によりリンカーを用い

ることにより容易に行うことができる。

- なお、このような発現ベクターは、種々のものがこの分野において周知であり、かつ市販されている。これらの発現ベクターは、宿主細胞内で複製するための複製開始点、プロモーター、外来遺伝子を挿入するための制限酵素部位を与える
- 5 クローニング部位及び薬剤耐性遺伝子等の選択マーカーを少なくとも含み、通常、転写を安定に終了させるターミネーターや、宿主が細菌の場合にはSD配列を含む。本発明の方法においては、これらの公知の発現ベクターのいずれをも採用することができる。

実施例

- 10 以下、本発明を実施例に基づきさらに具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

1. 米ぬか PLD の精製

- 精製にあたり、米ぬか PLD の精製に関する文献（高野ら，日本食品工業学会誌 34, 8-13(1987)）を参考にした。酵素活性は、ホスファチジルコリンを基質
- 15 とし、酵素反応によって生成したコリンをコリンオキシダーゼ法により定量して測定した（Imamura et al., J. Biochem. 83, 677-680(1978)）。ただし、PLD の酵素反応は、95℃、5 分の熱処理によって停止した。

- すなわち、イネ(*Oryza sativa*) “コシヒカリ” の米ぬか 100 g に 1 リットルのヘキサンを加え一昼夜攪拌、脱脂した後、10 g のホリクラール AT（商品
- 20 名：ポリビニルピロリドン、GAF Chemical 社製）、500 ml の 1 mM CaCl_2 、5 mM 2-メルカプトエタノールを含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7)を加え 1 時間攪拌し酵素を抽出した。抽出液を 8 層ガーゼで濾したのち 15,000 x g で 20 分遠心し、中間層を粗抽出液とした。粗抽出液を硫酸で処理し（65%飽和）、生じた沈澱を遠心分離（15,000 x g, 20 分）により集め、溶解後上記緩衝液に透
- 25 析した。透析後、遠心して沈澱を取り除き硫酸画分とした。

硫酸画分を緩衝液 A（10mM Tris-HCl pH 7, 1 mM CaCl_2 , 1 mM 2-メルカプトエタノール）で平衡化した DEAE-Cellulose（ワットマン社製）のカラム（2.0 x 10 cm）に添加した。約 100 ml の 50 mM NaCl を含む緩衝液 A で洗浄した後、50 - 350 mM NaCl の直線的な濃度勾配を持つ緩衝液 A 120 ml で溶離した。

PLD は NaCl 濃度 0.2 M 付近で溶離した。PLD 活性を示すフラクションを回収し、溶離液 (DEAE-Cellulose) とした。

溶離液 (DEAE-cellulose) に 3 M 硫酸を加え 1 M 硫酸溶液とし、1 M 硫酸を含む緩衝液 A で平衡化した Phenyl sepharose カラム (ファルマシア社製、2.6
5 x 10 cm) に添加した。1.0 - 0 M 硫酸の濃度勾配を持つ緩衝液 A 240 ml で溶離した。PLD は、硫酸濃度 0.1 M 付近で溶離した。活性を示すフラクションを回収し、緩衝液 A に対して透析し、溶離液 (Phenyl sepharose) とした。

溶離液 (Phenyl sepharose) を緩衝液 A で平衡化した Mono Q カラム (ファルマシア社製陰イオン交換カラム、16 x 10 cm) に添加し、50 - 350 mM NaCl
10 の濃度勾配を持つ緩衝液 A 150 ml で溶離した。PLD は、NaCl 濃度 210 mM から 235 mM にかけて溶離した。PLD 活性を示す分画を回収してこの溶液を緩衝液 A に対して透析し、溶離液 (Mono Q 1st) とした。

溶離液 (Mono Q 1st) を遠心限外濾過により 0.5 ml に濃縮し、0.1 M NaCl を含む緩衝液 A で平衡化した Superose 6 カラム (ファルマシア社製、1.0 x 3
15 0 cm) に添加し、同様の緩衝液で溶離した。PLD は、分子量 78 kDa と推定された。PLD 活性を示す分画を回収し溶離液 (Superose 6) とした。

溶離液 (Superose 6) に 2.5 ml の 40% キャリアアンフォライト (Pharmacia, pH 4.0-6.0) と蒸留水を加えて 50 ml とし、Rotofore (バイオラッド社製) を使用して、等電点電気泳動を行った。泳動は 2℃にて 12 W 定電力で 4 時間
20 行った。PLD 活性は、pH 4.9 付近に認められた。PLD 活性を示す分画を回収し、この溶液を緩衝液 A に対して透析し、等電点電気泳動画分とした。

等電点電気泳動画分を緩衝液 A で平衡化した Mono Q カラム (ファルマシア社製、0.5 x 5 cm) に添加し、50 - 350 mM NaCl の直線的な濃度勾配を持つ緩衝液 A で溶離した。PLD は、NaCl 濃度 210 mM 付近と 235 mM 付近で溶離した。
25 PLD 活性を示す 2 つの分画を回収し、溶離液 (Mono Q 2nd-I, II) とした。

溶離液 (Mono Q 2nd-I, II) の純度検定を、7.5%のアクリルアミドを用いた SDS- ポリアクリルアミド電気泳動 [laemmli(1970)] で行った。泳動後、ゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルー R250 で染色した。いずれの溶離液の場合も、分子量 82 kDa の位置に主たるバンドが認められ、溶離液 (Mono Q 2nd-II)

では、単一のバンドであった。

以上の精製により、溶離液 (Mono Q 2nd-I、II) の精製倍率は、粗抽出液に対してそれぞれ 380 倍、760 倍となった。

- 2 画分について酵素の性状解析を行った。その結果を下記表 1 に示す。至適 pH 測定に用いた緩衝液は酢酸ナトリウム (pH 4-6)、MES-NaOH (pH 5.5-7.0)、Tris-HCl (pH 7-9) でいずれも 100 mM とした。pH 安定性は、各 pH に 25 °C で 30 分間置いた後、残存活性を測定し、活性の低下が認められない範囲を示した。温度安定性は、4 °C、25 °C、37 °C および 50 °C の各温度に 30 分間置いた後、残存活性を測定した。基質特異性は、基質濃度 5 mM で測定し、ホスファチジルコリンに対する酵素作用を 100 とした相対活性で示した。

表 1

	Mono Q 2nd-I	Mono Q 2nd-II
K _m 値	0.29 mM	0.29 mM
至適 pH	6	6
pH 安定性	7-8	7-8
温度安定性	4-37 °C	4-37 °C
Ca ²⁺ 依存性	20 mM 以上	20 mM 以上
基質特異性		
ホスファチジルコリン	100	100
リゾホスファチジルコリン	13	12
スフィンゴミエリン	6	4

2. 精製したタンパク質が PLD であることの証明

- 純度検定の場合と同様に、溶離液 (Mono Q 2nd-I、II) をそれぞれ SDS- ポリアクリルアミド電気泳動にて分離し、PVDF 膜 (ミリポア社製) に転写後、染色した。82 kDa タンパク質のバンドを切り出し、プロテインシーケンサー (島津製作所、PSQ-1) にて N 末端アミノ酸配列を決定した。いずれも 10 残基まで解

析可能で、同一の配列であった。その配列を以下に記す。

Val Gly Lys Gly Ala Thr Lys Val Tyr Ser

- 2つの活性画分に認められる 82 kDa タンパク質の関係は明らかでないが、少なくともアミノ酸配列のレベルで類似性は高いと考えられ、抗体作製のための抗原調製において、両画分の混合液を用いて問題はないと判断した。

- 溶離液 (Mono Q 2nd-I, II) の混合液を、7.5%のアクリルアミドを用いた SDS- ポリアクリルアミド電気泳動で分離し、ゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルーR250 で染色した。82 kDa タンパク質のバンドを切り出し、電気溶出 (25 mM Tris、192 mM グリシン、0.025% SDS、100V、10 時間) により回収した。
- さらに電気透析 (15 mM ammonium bicarbonate、200V、5 時間) により SDS を除去後、凍結乾燥した。電気溶出、電気透析には、BIOTRAP (Schleicher & Schuell 社製) を用いた。

- 上記の方法で高度に精製した 82 kDa タンパク質を、50 μ g ずつ 7 日間隔でウサギに免疫した。免疫前および免疫 3 回後の血清を用いて、免疫滴定実験を行った。PLD 溶液 8.6×10^{-3} unit に 0-50 μ l の免疫前または免疫 3 回後の血清、50 μ l の 250 mM Tris-HCl (pH 7.0)、5 μ l の 50 mM CaCl_2 、50 μ l の 0.2% Triton X-100 (商品名) および水を加えて全量を 250 μ l とし、室温で 2.5 時間放置した。200 μ l の Protein A Sepharose (Pharmacia) を加え、室温で 2 時間ゆるやかに振とうした後、遠心 (500 x g、5 min) し、上清の酵素活性を測定した。血清無添加の場合の酵素活性を 100% とすると、免疫前の血清 20 μ l、50 μ l で酵素活性がそれぞれ 95%、88% であったのに対し、免疫 3 回後の血清 20 μ l、50 μ l ではそれぞれ 75%、30% であった。この結果は、82 kDa タンパク質が PLD であることを証明するものである。

3. 内部アミノ酸配列の決定

- PLD タンパク質の断片化は、ゲル中で断片化する方法 (Cleveland et al, J. Biol. Chem., 252, 1102 (1977)) で行った。2 と同様の方法で切り出した PLD タンパク質を含むゲルを、ペプチド分離用に調製した 15% アクリルアミドゲル上のスタッキングゲルウェルに挿入し、PLD タンパク質の 1/10 量の *Staphylococcus aureus* V8 protease (和光純薬社製) を重層後、泳動を開始した。プロモ

フェノールブルーが、スタッキングゲルの中央に到達した時点で泳動を中断し、30分後再び泳動を開始した。泳動終了後、PVDF膜に転写し、染色した。分子量20、14、13、11 および 10 kDa の位置に明瞭なバンドが認められた。分子量20、14 および 13 kDa のペプチド断片のバンドを切り出し、プロテインシーケンサーにてアミノ酸配列を決定した。以下、それらの配列を記す。

20 kDa Asn Tyr Phe His Gly Ser Asp Val Asn ? Val Leu ? Pro Arg Asn
Pro Asp Asp(Asp) ? ? Ile

14 kDa Thr ? Asn Val Gln Leu Phe Arg Ser Ile Asp Gly Gly Ala Ala Phe
Gly Phe Pro Asp Thr Pro Glu Glu Ala Ala Lys ? Gly Leu Val Ser
10 Gly

13 kDa Ile Ala Met Gly Gly Tyr Gln Phe Tyr His Leu Ala Thr Arg Gln Pro
Ala Arg Gly Gln Ile His Gly Phe Arg Met Ala Leu ? Tyr Glu His
Leu Gly Met Leu ? Asp Val Phe

(式中、? は、アミノ酸を特定することのできなかった残基を、また () は、
15 他のアミノ酸である可能性も高い残基を示している。)

4. イネ未熟種子 cDNA ライブラリーの作製

全 RNA は、開花5日後の未熟種子から、SDS-フェノール法にしたがって抽出し、塩化リチウム沈澱により調製した。Poly(A)⁺RNA の調製は、Oligotex-dT30 (宝酒造社製) を使用して、製造者の手引書にしたがって行った。cDNA クローニングには、cDNA 合成システムプラス (アマシャム社製)、cDNA クローニングシステムλ gt10 (アマシャム社製) を使用した。ただし、クローニングベクターとして、λ ZAPII ベクター (ストラタジーン社製)、宿主細胞として XL1-Blue を使用した。

5. プローブの作製

25 PLD のアミノ酸配列に該当するオリゴヌクレオチドを DNA 合成装置 (アブライドバイオシステムズ社製) を用いて合成した。その配列とそれらが該当するアミノ酸配列を下記する。

20KF 5' AAYTAYTTYCAYGG 3'

20KR1 5' RTCRTCRTCNGGRTT 3'

(式中、Rはプリン類AまたはGを示し、Yはピリミジン類TまたはCを示し、NはG、A、TまたはCの何れかを示す。)

20KFは、分子量 20 kDa のペプチド中に見いだされるアミノ酸配列

Asn Tyr Phe His Gly

- 5 をコードしている DNA 塩基配列を包含する 32 種のオリゴヌクレオチドの混合物であり、20KR1 は同ペプチド中に見いだされるアミノ酸配列

Asn Pro Asp Asp(Asp)

をコードしている DNA 塩基配列の相補鎖を包含する 128 種のオリゴヌクレオチドの混合物である。

- 10 cDNA 合成反応は 10 ng の Poly(A)⁺RNA、0.3 μ g のランダムヘキサマー (dN6)、10 U の RNase 阻害剤 (RNAGuard、ファルマシア社製)、1 mM の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、1 x PCR 緩衝液 (宝酒造社製)、50 mM の塩化マグネシウムおよび 100 U の逆転写酵素 (M-MuLV RTase, BRL 社製) を使用して全容積 10 μ l で行った。反応は 37 °C で 30 分間行った後、95°C で 5 分間熱処理し氷上で保持した。

- 複製連鎖反応 (PCR) を、鋳型として上記 cDNA、プライマーとして 20KF と 20KR1 を使用して実施した。反応は、10 μ l の cDNA 合成反応液、50 pmol の各々のプライマーの混合物、200 μ M の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、1 x PCR 緩衝液 (宝酒造社製) および 2.5 U AmpliTaq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) を使用して全容積 50 μ l で行った。反応は下記の温度条件に従って 30 周期を繰り返した；DNA サーマサイクラー (パーキン エルマー シータス社製) 中で：1 分間にわたり 94 °C、1 分間にわたり 40 °C、および 2 分 30 秒間にわたり 72 °C。

- PCR 生成物を、2%のアガロースゲル上で分離した。若干数の断片が、エチジウムブロマイド染色法により検出された。その 1 つは 94 bp の長さであり、予想通りの大きさであった。

PCR 断片をゲルから切り出し、pUC19 プラスミド中にサブクローニングしたサブクローニングした PCR 断片の DNA 配列を、T7 sequencing キット (ファルマシア社製) を使用するジデオキシ法により決定した。2 つのプライマー間

には、予想されたアミノ酸配列をコードする DNA 塩基配列が認められた。以下に、プライマー間の DNA 塩基配列とそれがコードするアミノ酸を記す。

C TCT GAC GTG AAC TGT GTT CTA TGC CCT CGC

Ser Asp Val Asn Cys Val Leu Cys Pro Arg

- 5 上記オリゴヌクレオチドに、DNA 5' 末端標識キット MEGALABEL (宝酒造社製) を使用してアイソトープ 32 P (アマシャム社製) を取り込ませ、放射性オリゴヌクレオチドプローブとした。

6. PLD 遺伝子含有クローンのスクリーニング

- 上記放射性オリゴヌクレオチドをプローブとして、cDNA ライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーション溶液は、0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2)、7% SDS、1mM EDTA、100 μ g/ml サケ精子 DNA とし、ハイブリダイゼーションはこれにプローブを加え 45 $^{\circ}$ C で 16 時間行った。洗浄液は、0.3 M NaCl、30 mM クエン酸ナトリウムとし、45 $^{\circ}$ C、20 分の洗浄を 2 回行った。陽性ブランクを単離し、 λ ZAPII クローニングベクターの製造者により記述されている方法で、in vivo で pBluescript プラスミド (ストラタジーン社製) にサブクローニングした。ジデオキシ法により塩基配列を決定したところ、3 で決定した内部アミノ酸配列をコードする領域が存在した。
- 10
- 15

7. 5' 末端領域の塩基配列決定

- 6 に記載した方法では完全長の cDNA を含むクローンを単離できなかったため、RACE 法 (Edwards et al, Nucleic Acids Res., 19, 5227-5232 (1991)) により 5' 末端領域を含む DNA 断片を調製した。5'-AmpliFINDER RACE Kit (クローンテック社製) を、添付マニュアルに従って使用した。6 で決定した cDNA の塩基配列をもとにオリゴ DNA を合成し、4 に記載した方法で調製した mRNA を鋳型として PCR を行った。PCR 産物を PCR II ベクター (インビトロジェン社製) にサブクローニングし、ジデオキシ法にて塩基配列を決定した。このようにして決定されたイネ PLD の cDNA の塩基配列及びそれがコードする推定アミノ酸配列を配列表の配列番号 2 に示す。翻訳は配列表 2 に示した 182 番目の塩基から開始されると推定された。それは、36 塩基上流に終始コドンが存在していることによる。
- 20
- 25

8. PLDcDNA クローンに対応する PLD ゲノムクローンの単離およびプロモーター領域の同定

pBluescript プラスミド中にクローニングした、6 で決定した PLDcDNA に対応する PLD 遺伝子の調節配列を担うゲノム DNA クローンを単離するため、イネ
5 コシヒカリのゲノムライブラリーを構築した。これは、コシヒカリ実生葉 DNA を MboI で部分消化し、シュクロース勾配遠心分離によって 16~20kb 大のフラクションを精製し、ラムダ DASH II (ストラタジーン社製)、GigapackII Gold (ストラタジーン社製) を使用することにより行った。PLDcDNA クローンをプローブとして、ゲノムライブラリーをスクリーニングした。スクリーニングは 6 に
10 従った。ただし、ハイブリダイゼーションは 65℃で 16 時間、洗浄液は、0.5xSSC、0.1% SDS とし、65℃、20 分の洗浄を 2 回行った。ハイブリダイズしたゲノムクローンの塩基配列をジデオキシ法により決定したところ、6 で決定した cDNA 配列と相同な領域が存在した。

転写開始部位は、7 に記載した方法で決定した。転写開始部位近傍には”TA
15 TA” コンセンサス配列ボックスが認められた。ATG 翻訳開始部位は、DNA 配列決定により判ったところでは、クローンの翻訳読み枠内の最も上流の ATG コドンとして、またイネにおいて合成される mRNA 上の最初にアクセス可能な ATG コドンとして決定した。

cDNA クローンにハイブリダイズしたゲノムクローンの一部の DNA 配列を配列
20 番号 3 に示す。ゲノム DNA 配列において、ATG 翻訳開始コドンで始まり、その対応 cDNA 配列と重なり合う読み枠が同定されている。プロモーター領域は、ATG 翻訳開始コドンの上流にあって、その直前から開始している。

9. イントロンの特定と遺伝子発現に及ぼす作用の解析

cDNA (配列番号 2) とゲノム DNA (配列番号 3) の比較から、PLD の
25 遺伝子に 3 箇所イントロンが存在することが明かとなった。そのうち、mRNA の 5' 末端非翻訳領域に対応する位置に存在する 173 bp (すなわち、配列番号 3 で示される塩基配列の第 1666 塩基から第 1838 塩基、この配列を配列番号 4 に示す) のイントロンについて、植物細胞における遺伝子発現におよぼす影響を調べた。エキソン部分を 5 ベースずつ含む 15 mer のプライマー (5'-A

CCCGTAAGCCCAG-3', 3'-CCCCGCGTCCATCC-5') を合成し、ゲノムクローンを鋳型として「5. プローブの作製」の項に記した方法でPCRを行った。PCR産物をPCR II ベクターにサブクローニングし、そこからEcoRIで切り出した断片を平滑末端処理した後プラスミド pBI221 (東洋紡社製) のSmaIサイトに組み込んだ(図1参照)。以下、既報(Shimamoto et al. Nature, 338, 274-276 (1989))の方法にしたがってイネ培養細胞(Baba et al. Plant Cell Physiol. 27, 463-471 (1986))に上記組換えプラスミドを導入後、 β -glucuronidase (GUS)活性を測定した。表2に示したように、イントロンの導入によりGUS活性の増大が認められた。また、表3に示したとおり、イントロンが逆方向に組み込まれた場合にもGUS活性の増大が認められた。なお、イントロンの方向は、イントロン配列中に存在するBglIIサイトとpBI221に存在するBamHIサイトを利用して、両酵素で切り出される断片の長さにより特定した。

表2 プロトプラストにおけるGUS活性

プラスミド	GUS活性
pBI221	10.4
pBI221+イントロン	105.7

(pmol MU/min./mg protein)

15

表3 プロトプラストにおけるGUS活性

プラスミド	GUS活性
pBI221	8.8
pBI221+イントロン	79.4
pBI221+イントロン(逆方向)	54.2

(pmol MU/min./mg protein)

配列表

配列番号：1

配列の長さ：183

配列の型：核酸

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：Oryza sativa

配列

```

ACCCGGTAAG CCCAGTGTGC TTAGGCTAAG CGCACTAGAG CTTCTTGCTC GCTTGCTTCT   60
TCTCCGCTCA GATCTGCTTG CTTGCTTGCT TCGCTAGAAC CCTACTCTGT GCTGCGAGTG   120
TCGCTGCTTC GTCTTCCTTC CTCAAGTTCG ATCTGATTGT GTGTGTGGGG GGGCGCAGGT   180
AGG                                     183

```

配列番号：2

配列の長さ：3040

配列の型：核酸

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：Oryza sativa

配列

```

AGTCTCTCTT CTCCGCAAT TTTATAATCT CGATCGATCC AATCTGCTCC CTTCTTCTT   60
CTACTCTCCC CATCTCGGCT CTCGCCATCG CCATCCTCCT CTCCCTTCCC GGAGAAGACG   120
CCTCCCTCCG CCGATCACCA CCCGGTAGGG CGAGGAGGGA GCCAAATCCA AATCAGCAGC   180
C ATG GCG CAG ATG CTG CTC CAT GGG ACG CTG CAC GCC ACC ATC TTC GAG   229
  Met Ala Gln Met Leu Leu His Gly Thr Leu His Ala Thr Ile Phe Glu
      1             5             10             15
GCG GCG TCG CTC TCC AAC CCG CAC CGC GCC AGC GGA AGC GCC CCC AAG   277
Ala Ala Ser Leu Ser Asn Pro His Arg Ala Ser Gly Ser Ala Pro Lys
      20             25             30

```


TTC ATC CGC AAG TTT GTG GAG GGG ATT GAG GAC ACT GTG GGT GTC GGC	325
Phe Ile Arg Lys Phe Val Glu Gly Ile Glu Asp Thr Val Gly Val Gly	
35 40 45	
AAA GGC GCC ACC AAG GTG TAT TCT ACC ATT GAT CTG GAG AAA GCT CGT	373
Lys Gly Ala Thr Lys Val Tyr Ser Thr Ile Asp Leu Glu Lys Ala Arg	
50 55 60	
GTA GGG CGA ACT AGG ATG ATA ACC AAT GAG CCC ATC AAC CCT CGC TGG	421
Val Gly Arg Thr Arg Met Ile Thr Asn Glu Pro Ile Asn Pro Arg Trp	
65 70 75 80	
TAT GAG TCG TTC CAC ATC TAT TGC GCT CAT ATG GCT TCC AAT GTG ATC	469
Tyr Glu Ser Phe His Ile Tyr Cys Ala His Met Ala Ser Asn Val Ile	
85 90 95	
TTC ACT GTC AAG ATT GAT AAC CCT ATT GGG GCA ACG AAT ATT GGG AGG	517
Phe Thr Val Lys Ile Asp Asn Pro Ile Gly Ala Thr Asn Ile Gly Arg	
100 105 110	
GCT TAC CTG CCT GTC CAA GAG CTT CTC AAT GGA GAG GAG ATT GAC AGA	565
Ala Tyr Leu Pro Val Gln Glu Leu Leu Asn Gly Glu Glu Ile Asp Arg	
115 120 125	
TGG CTC GAT ATC TGT GAT AAT AAC CGC GAG TCT GTT GGT GAG AGC AAG	613
Trp Leu Asp Ile Cys Asp Asn Asn Arg Glu Ser Val Gly Glu Ser Lys	
130 135 140	
ATC CAT GTG AAG CTT CAG TAC TTC GAT GTT TCC AAG GAT CGC AAT TGG	661
Ile His Val Lys Leu Gln Tyr Phe Asp Val Ser Lys Asp Arg Asn Trp	
145 150 155 160	
GCG AGG GGT GTC CGC AGT ACC AAG TAT CCA GGT GTT CCT TAC ACC TTC	709
Ala Arg Gly Val Arg Ser Thr Lys Tyr Pro Gly Val Pro Tyr Thr Phe	
165 170 175	
TTC TCT CAG AGG CAA GGG TGC AAA GTT ACC TTG TAC CAA GAT GCT CAT	757
Phe Ser Gln Arg Gln Gly Cys Lys Val Thr Leu Tyr Gln Asp Ala His	

180	185	190	
GTC CCA GAC AAC TTC ATT CCA AAG ATT CCG CTT GCC GAT GGC AAG AAT			805
Val Pro Asp Asn Phe Ile Pro Lys Ile Pro Leu Ala Asp Gly Lys Asn			
195	200	205	
TAT GAA CCC CAC AGA TGC TGG GAG GAT ATC TTT GAT GCT ATA AGC AAT			853
Tyr Glu Pro His Arg Cys Trp Glu Asp Ile Phe Asp Ala Ile Ser Asn			
210	215	220	
GCT CAA CAT TTG ATT TAC ATC ACT GGC TGG TCT GTA TAC ACT GAG ATC			901
Ala Gln His Leu Ile Tyr Ile Thr Gly Trp Ser Val Tyr Thr Glu Ile			
225	230	235	240
ACC TTG GTT AGG GAC TCC AAT CGT CCA AAA CCT GGA GGG GAT GTC ACC			949
Thr Leu Val Arg Asp Ser Asn Arg Pro Lys Pro Gly Gly Asp Val Thr			
245	250	255	
CTT GGG GAG TTG CTC AAG AAG AAG GCC AGT GAA GGT GTT CGG GTC CTC			997
Leu Gly Glu Leu Leu Lys Lys Lys Ala Ser Glu Gly Val Arg Val Leu			
260	265	270	
ATG CTT GTG TGG GAT GAC AGG ACT TCA GTT GGT TTG CTA AAG AGG GAT			1045
Met Leu Val Trp Asp Asp Arg Thr Ser Val Gly Leu Leu Lys Arg Asp			
275	280	285	
GGC TTG ATG GCA ACA CAT GAT GAG GAA ACT GAA AAT TAC TTC CAT GGC			1093
Gly Leu Met Ala Thr His Asp Glu Glu Thr Glu Asn Tyr Phe His Gly			
290	295	300	
TCT GAC GTG AAC TGT GTT CTA TGC CCT CGC AAC CCT GAT GAC TCA GGC			1141
Ser Asp Val Asn Cys Val Leu Cys Pro Arg Asn Pro Asp Asp Ser Gly			
305	310	315	320
AGC ATT GTT CAG GAT CTG TCG ATC TCA ACT ATG TTT ACA CAC CAT CAG			1189
Ser Ile Val Gln Asp Leu Ser Ile Ser Thr Met Phe Thr His His Gln			
325	330	335	
AAG ATA GTA GTT GTT GAC CAT GAG TTG CCA AAC CAG GGC TCC CAA CAA			1237

Lys Ile Val Val Val Asp His Glu Leu Pro Asn Gln Gly Ser Gln Gln
 340 345 350
 AGG AGG ATA GTC AGT TTC GTT GGT GGC CTT GAT CTC TGT GAT GGA AGG 1285
 Arg Arg Ile Val Ser Phe Val Gly Gly Leu Asp Leu Cys Asp Gly Arg
 355 360 365
 TAT GAC ACT CAG TAC CAT TCT TTG TTT AGG ACA CTC GAC AGT ACC CAT 1333
 Tyr Asp Thr Gln Tyr His Ser Leu Phe Arg Thr Leu Asp Ser Thr His
 370 375 380
 CAT GAT GAC TTC CAC CAG CCA AAC TTT GCC ACT GCA TCA ATC AAA AAG 1381
 His Asp Asp Phe His Gln Pro Asn Phe Ala Thr Ala Ser Ile Lys Lys
 385 390 395 400
 GGT GGA CCT AGA GAG CCA TGG CAT GAT ATT CAC TCA CGG CTG GAA GGG 1429
 Gly Gly Pro Arg Glu Pro Trp His Asp Ile His Ser Arg Leu Glu Gly
 405 410 415
 CCA ATC GCA TGG GAT GTT CTT TAC AAT TTC GAG CAG AGA TGG AGA AAG 1477
 Pro Ile Ala Trp Asp Val Leu Tyr Asn Phe Glu Gln Arg Trp Arg Lys
 420 425 430
 CAG GGT GGT AAG GAT CTC CTT CTG CAG CTC AGG GAT CTG TCT GAC ACT 1525
 Gln Gly Gly Lys Asp Leu Leu Leu Gln Leu Arg Asp Leu Ser Asp Thr
 435 440 445
 ATT ATT CCA CCT TCT CCT GTT ATG TTT CCA GAG GAC AGA GAA ACA TGG 1573
 Ile Ile Pro Pro Ser Pro Val Met Phe Pro Glu Asp Arg Glu Thr Trp
 450 455 460
 AAT GTT CAG CTA TTT AGA TCC ATT GAT GGT GGT GCT GCT TTT GGG TTC 1621
 Asn Val Gln Leu Phe Arg Ser Ile Asp Gly Gly Ala Ala Phe Gly Phe
 465 470 475 480
 CCT GAT ACC CCT GAG GAG GCT GCA AAA GCT GGG CTT GTA AGC GGA AAG 1669
 Pro Asp Thr Pro Glu Glu Ala Ala Lys Ala Gly Leu Val Ser Gly Lys
 485 490 495

GAT CAA ATC ATT GAC AGG AGC ATC CAG GAT GCA TAC ATA CAT GCC ATC 1717
Asp Gln Ile Ile Asp Arg Ser Ile Gln Asp Ala Tyr Ile His Ala Ile
500 505 510

CGG AGG GCA AAG AAC TTC ATC TAT ATA GAG AAC CAA TAC TTC CTT GGA 1765
Arg Arg Ala Lys Asn Phe Ile Tyr Ile Glu Asn Gln Tyr Phe Leu Gly
515 520 525

AGT TCC TAT GCC TGG AAA CCC GAG GGC ATC AAG CCT GAA GAC ATT GGT 1813
Ser Ser Tyr Ala Trp Lys Pro Glu Gly Ile Lys Pro Glu Asp Ile Gly
530 535 540

GCC CTG CAT TTG ATT CCT AAG GAG CTT GCA CTG AAA GTT GTC AGT AAG 1861
Ala Leu His Leu Ile Pro Lys Glu Leu Ala Leu Lys Val Val Ser Lys
545 550 555 560

ATT GAA GCC GGG GAA CGG TTC ACT GTT TAT GTT GTG GTG CCA ATG TGG 1909
Ile Glu Ala Gly Glu Arg Phe Thr Val Tyr Val Val Val Pro Met Trp
565 570 575

CCT GAG GGT GTT CCA GAG AGT GGA TCT GTT CAG GCA ATC CTG GAC TGG 1957
Pro Glu Gly Val Pro Glu Ser Gly Ser Val Gln Ala Ile Leu Asp Trp
580 585 590

CAA AGG AGA ACA ATG GAG ATG ATG TAC ACT GAC ATT ACA GAG GCT CTC 2005
Gln Arg Arg Thr Met Glu Met Met Tyr Thr Asp Ile Thr Glu Ala Leu
595 600 605

CAA GCC AAG GGA ATT GAA GCG AAC CCC AAG GAC TAC CTC ACT TTC TTC 2053
Gln Ala Lys Gly Ile Glu Ala Asn Pro Lys Asp Tyr Leu Thr Phe Phe
610 615 620

TGC TTG GGT AAC CGT GAG GTG AAG CAG GCT GGG GAA TAT CAG CCT GAA 2101
Cys Leu Gly Asn Arg Glu Val Lys Gln Ala Gly Glu Tyr Gln Pro Glu
625 630 635 640

GAA CAA CCA GAA GCT GAC ACT GAT TAC AGC CGA GCT CAG GAA GCT AGG 2149
Glu Gln Pro Glu Ala Asp Thr Asp Tyr Ser Arg Ala Gln Glu Ala Arg

645	650	655	
AGG TTC ATG ATC TAT GTC CAC ACC AAA ATG ATG ATA GTT GAC GAT GAG			2197
Arg Phe Met Ile Tyr Val His Thr Lys Met Met Ile Val Asp Asp Glu			
660	665	670	
TAC ATC ATC ATC GGT TCT GCA AAC ATC AAC CAG AGG TCG ATG GAC GGC			2245
Tyr Ile Ile Ile Gly Ser Ala Asn Ile Asn Gln Arg Ser Met Asp Gly			
675	680	685	
GCT AGG GAC TCT GAG ATC GCC ATG GGC GGG TAC CAG CCA TAC CAT CTG			2293
Ala Arg Asp Ser Glu Ile Ala Met Gly Gly Tyr Gln Pro Tyr His Leu			
690	695	700	
GCG ACC AGG CAA CCA GCC CGT GGC CAG ATC CAT GGC TTC CGG ATG GCG			2341
Ala Thr Arg Gln Pro Ala Arg Gly Gln Ile His Gly Phe Arg Met Ala			
705	710	715	720
CTG TGG TAC GAG CAC CTG GGA ATG CTG GAT GAT GTG TTC CAG CGC CCC			2389
Leu Trp Tyr Glu His Leu Gly Met Leu Asp Asp Val Phe Gln Arg Pro			
725	730	735	
GAG AGC CTG GAG TGT GTG CAG AAG GTG AAC AGG ATC GCG GAG AAG TAC			2437
Glu Ser Leu Glu Cys Val Gln Lys Val Asn Arg Ile Ala Glu Lys Tyr			
740	745	750	
TGG GAC ATG TAC TCC AGC GAC GAC CTC CAG CAG GAC CTC CCT GGC CAC			2485
Trp Asp Met Tyr Ser Ser Asp Asp Leu Gln Gln Asp Leu Pro Gly His			
755	760	765	
CTC CTC AGC TAC CCC ATT GGC GTC GCC AGC GAT GGT GTG GTG ACT GAG			2533
Leu Leu Ser Tyr Pro Ile Gly Val Ala Ser Asp Gly Val Val Thr Glu			
770	775	780	
CTG CCC GGG ATG GAG TAC TTT CCT GAC ACA CGG GCC CGC GTC CTC GGC			2581
Leu Pro Gly Met Glu Tyr Phe Pro Asp Thr Arg Ala Arg Val Leu Gly			
785	790	795	800
GCC AAG TCG GAT TAC ATG CCC CCC ATC CTC ACC TCA TAGACGAGGA AGCACT			2633

Ala Lys Ser Asp Tyr Met Pro Pro Ile Leu Thr Ser

805

810

ACACTACAAT CTGCTGGCTT CTCCTGTCAG TCCTTCTGTA CTTCTTCAGT TTGGTGGCGA 2693
GATGGTATGG CCGTTGTTCA GAATTTCTTC AGAATAGCAG TTGTTACAGT TGTGAATCAT 2753
AAAGTAATAA GTGCAGTATC TGTGCATGGT TGAGTTGGGA AGAAGATCGG GGATGCAATG 2813
ATGCTTGTA AGTTGTGATG CCGTTTGTA GATGGGAAGT TGGGAACACTAC TAAGTAATTG 2873
GCATGATTGT ACTTTGCACT ACTGTTTAGC GTTGTGATA CTGGTTAACC GTGTGTTTAT 2933
CTGAACCTGA TTCTTGATGC AGTTTGTGGC ATTACCAGTT TATCATCGTT CTTACAGGAAA 2993
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 3040

配列番号：3

配列の長さ：2799

配列の型：核酸

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：Oryza sativa

配列

CAAGGGTGTA CATAGATTTG TCTCGTAAAA TAGTATTATA ATATTATAAA CTTATTACTC 60
TATCCGTTCT AAAATATAAG AACCTTATGA CTGGATGGAA CATTTCCTAG TACTACGAAT 120
CTGAACACAT GTCTAGATTC ATAGTACTAG GAAATGTCTC ATCGCGGTAC TAGGTTCTTA 180
TATTTTAGGA TGGAGGGAGT TTAATATAAA ACTAATGGTT AGAACTTTGA AAGTTTGATT 240
TTAAATGTCA AATATTTATG GCTGGAGGTA GTATAATATG TTTTTTTTGG GACGTAGACT 300
AGGTAGTATA ATATGTTTGG TTGTGTTTAG ATCCAATATT TGGATCCAAA CTTCAATCAT 360
TTCCATCAC ATCAACTTGT CATATACACA TAACTTTTCA GTCACATCAT CCCCATTTC 420
AACCAAAATC AAACCTTGGC CTGAACATAA CACAACCTTT GGGCCCGTTT AGTTCCCAAA 480
TTTTTTTCCC AAAACATCA CATCGAATCT TTGGACACAT GCATGAAGCA TTAAATATAG 540
ATAAAAAGAA AAATAATTG CACAGTTATG GAGGAAATCG CGAGACGAAT CTTTAAAGCC 600
TAATTAGTCC GTGATTAGCC ATAAGTGCTA CAGTAACCCA ATTGTGCTAA TGACGGCTTA 660
ATTAGTCTCC ACAAGATTCG TCTCGCAGTT TCCAGGCGAG TTCTGAAATT AGTTTTTTCA 720

TTCGTGTCCG AAAACCCCTT CCGACATCCG GTCAAACGTT CGATATGACA CCCACAAATT 780
TTCTTTTCCC CAACTAAACA CACCCTTTAT CTCTTACCCT CTGGCTCTTT CAGTAGGCAT 840
ATCCAAGACA GCTGGTAATG CAGGCTCGGA CATAATTTGA CAGTTACGTT CATGTGACCG 900
ACGGTTGATG CTAGTGCAAC TGCAACATAC TGTTCAGATG GATGTCCCAA CGAGCTCAAA 960
ACAACCTAGG TGGCGCGTCG CGATTTCATCA ATAACCTCAA TGGAAGCGCA AGTGCACGTA 1020
CGAAAATGAC AGCGAGTGAG GTGGCGAGCC TCACCTTGGT GATCCCAACC GGATAAGCTA 1080
TGCATCAGCC AGTTTCGTGG GGCTGCACAT TTCGTGGAAC ACCTGGAGTC CACGCCGCCG 1140
GCGACGTCGG CACAGCGCGC CCGCCCACCG CCCACGCACG CGCTTGACTC CACCCATGTT 1200
CTCCCTTCTC GACGCCCGCG AAGCCAGCGA ACCGATCCGA GGAAGTCAAG CCCCCACCGC 1260
CACTTGGACC GACCTCGGGA CGACGACGCC CCCGCGCTCT TCTAGACGCG CGGACGACGC 1320
GGGCGTGGC TCCGCGACGC GACGTCGCGG TCATGGAGTA ACCGCGACGG ACAGATACTT 1380
CTACCCGTTT TTAACCTCGC CTCCTCCTCC TCCCGGCTCG AGATCCGTGG CCACGACGCG 1440
TGGTGGGAAA CCGGGAACGA CGTGACGCA CGCACACAGG GCAAGTTTCA GTAGAAAAAT 1500
CGCCGGCATC CAGATCGGGA CAGTCTCTCT TCTCCCGCAA TTTTATAATC TCGCTCGATC 1560
CAATCTGCTC CCCTTCTTCT TCTACTCTCC CCATCTCGGC TCTCGCCATC GCCATCCTCC 1620
TCTCCCTTCC CGGAGAAGAC GCCTCCCTCC GCCGATCACC ACCCGGTAAG CCCAGTGTGC 1680
TTAGGCTAAG CGCACTAGAG CTTCTTGCTC GCTTGCTTCT TCTCCGCTCA GATCTGCTTG 1740
CTTGCTTGCT TCGCTAGAAC CCTACTCTGT GCTGCGAGTG TCGCTGCTTC GTCTTCCTTC 1800
CTCAAGTTCT ATCTGATTGT GTGTGTGGGG GGGCGCAGGT AGGGCGAGGA GGGAGCCAAA 1860
TCCAAATCAG CAGCC ATG GCG CAG ATG CTG CTC CAT GGG ACG CTG CAC GCC 1911

Met Ala Gln Met Leu Leu His Gly Thr Leu His Ala

1

5

10

ACC ATC TTC GAG GCG GCG TCG CTC TCC AAC CCG CAC CGC GCC AGC GGA 1959

Thr Ile Phe Glu Ala Ala Ser Leu Ser Asn Pro His Arg Ala Ser Gly

15

20

25

AGC GCC CCC AAG TTC ATC CGC AAG GTTCGGACCC TTCTCCTTAA TCTACTCGTC 2013

Ser Ala Pro Lys Phe Ile Arg Lys

30

35

TTTGCTCTTG CTCTTTTCT TTTGTGTCCC TTTCTTGTGT GTGCGTTTGC ATGAGCCCGA 2073

ATTTGATCTG CTAGTGCACA GTACAGTCAG ATACACTGAA ACGATCTGGA AATTCTGGAT 2133
TATTAGGAAA AATAAGAGG TAGTAGACAA GAATTGGAGA TACTTTCTAT CAAGATTGGT 2193
CTATTATGCT TGGCCATTTC TTGTTTGACC CAAGTACTTC TTTGAATCTA GAGTTTGCTG 2253
TGTGTGATGT GGTGTGTGTT TGTGTCACCA AAAATCTTCA TTAGCTAAAA CTGAAATTTT 2313
ATTTATTAAC TGACCTACTA AAAATGTAGA GTTCTCTGTG TGTGATGTGT GCTTGTGTCA 2373
CCAAAAATCT TGATTGATA GAGTTTTTAT TTATTATTAA ACTGACCTAC TACAAATCTA 2433
TTGCTGTATG CTATGTGTGT CTGTATCACC TGAAATGCAA TGTCTTCTTC TTTGTTGTTC 2493
TTGATCTAAC ACGTGAGCTC ATGTCAACAG TTT GTG GAG GGG ATT GAG GAC ACT 2547

Phe Val Glu Gly Ile Glu Asp Thr

40

GTG GGT GTC GGC AAA GGC GCC ACC AAG GTG TAT TCT ACC ATT GAT CTG 2595
Val Gly Val Gly Lys Gly Ala Thr Lys Val Tyr Ser Thr Ile Asp Leu

45 50 55 60

GAG AAA GCT CGT GTA GGG CGA ACT AGG ATG ATA ACC AAT GAG CCC ATC 2643
Glu Lys Ala Arg Val Gly Arg Thr Arg Met Ile Thr Asn Glu Pro Ile

65 70 75

AAC CCT CGC TGG TAT GAG TCG TTC CAC ATC TAT TGC GCT CAT ATG GCT 2691
Asn Pro Arg Trp Tyr Glu Ser Phe His Ile Tyr Cys Ala His Met Ala

80 85 90

TCC AAT GTG ATC TTC ACT GTC AAG ATT GAT AAC CCT ATT GGG GCA ACG 2739
Ser Asn Val Ile Phe Thr Val Lys Ile Asp Asn Pro Ile Gly Ala Thr

95 100 105

AAT ATT GGG AGG GCT TAC CTG CCT GTC CAA GAG CTT CTC AAT GGA GAG 2787
Asn Ile Gly Arg Ala Tyr Leu Pro Val Gln Glu Leu Leu Asn Gly Glu

110 115 120

GAG ATT GAC AGA 2799

Glu Ile Asp Arg

125

配列番号：4

配列の長さ：173

配列の型：核酸

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：Oryza sativa

配列

```
GTAAGCCCAG TGTGCTTAGG CTAAGCGCAC TAGAGCTTCT TGCTCGCTTG CTTCTTCTCC 60
GCTCAGATCT GCTTGCTTGC TTGCTTCGCT AGAACCCTAC TCTGTGCTGC GAGTGTGCT 120
GCTTCGTCTT CCTTCCTCAA GTTCGATCTG ATTGTGTGTG TGGGGGGGCG CAG 173
```

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有する単離された DNA 断片及び該塩基配列において 1 又は複数のヌクレオチドが付加、挿入、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有する単離された DNA 断片。
5
2. 配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有する請求項 1 記載の DNA 断片。
3. 配列表の配列番号 4 で示される塩基配列を有する単離された DNA 断片及び該塩基配列において 1 又は複数のヌクレオチドが付加、挿入、欠失若しくは置換されておりかつその下流に存在する遺伝子の発現を促進する作用を有する請求項
10 1 記載の DNA 断片。
4. 配列表の配列番号 4 で示される塩基配列を有する請求項 3 記載の DNA 断片。
5. 請求項 1 記載の DNA 断片と、その下流に機能的に連結された発現すべき外来遺伝子とを含む組換えベクター。
6. 前記 DNA 断片は配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有する請求項 5
15 記載の組換えベクター。
7. 前記 DNA 断片は配列表の配列番号 4 で示される塩基配列を有する請求項 5 記載の組換えベクター。
8. 請求項 3 記載の組換えベクターを宿主細胞に導入し、前記外来遺伝子を発現させることから成る、外来遺伝子の発現方法。
- 20 9. 前記 DNA 断片は配列表の配列番号 1 で示される塩基配列を有する請求項 8 記載の方法。
10. 前記 DNA 断片は配列表の配列番号 4 で示される塩基配列を有する請求項 9 記載の方法。

図面

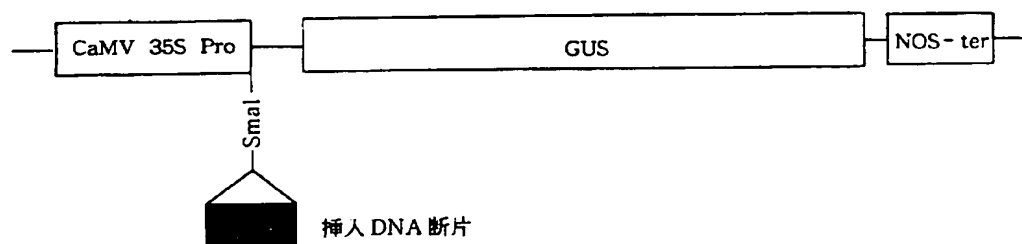


図 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82, C12N9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12N9/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 03-103182, A (Mitsubishi Kasei Corp.), April 30, 1991 (30. 04. 91) (Family: none)	1 - 10
A	Judy C. et al. "Introns increase gene expression in cultured maized cells" GENE & DEVELOPMENT (1987) Vol. 1, p. 1183-1200	1 - 10
A	Akira T. et al. "Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco in correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron" Nucleic Acids Research (1990) Vol. 18, No. 23, p. 6767-6770	1 - 10
PA	Jun U. et al. "Purification and Characterization of Phospholipase D (PLD) from rice (Oryza sativa L.) and Cloning of cDNA for PLD from Rice and Maize (Zeamays L.)" Plant Cell Physiol. (1995) Vol. 36, No. 5, p. 903-914	1 - 10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 19, 1996 (19. 06. 96)

Date of mailing of the international search report

July 2, 1996 (02. 07. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/00812

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/11, C12N15/63, C12N15/82, C12N9/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/00, C12N9/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, WPI, WPI/L, BIOSIS REVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP.03-103182.A (三菱化成株式会社) 30.4月.1991(30.4.91) (ファミリーなし)	1-10
A	Judy C. et al. "Introns increase gene expression in cultured maize cells" GENE & DEVELOPMENT (1987) 第1巻 p.1183-1200	1-10
A	Akira T. et al. "Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron" Nucleic Acids Research (1990) 第18巻 第23号 p.6767-6770	1-10
PA	Jun U. et al. "Purification and Characterization of Phospholipase D (PLD) from rice (Oryza sativa L.) and Cloning of cDNA for PLD from Rice and Maize (Zea mays L.)" Plant Cell Physiol. (1995) 第36巻 第5号 p.903-914	1-10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.06.96

国際調査報告の発送日

02.07.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449